

Дениварова Наталья Александровна

ОСОБЕННОСТИ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
2,4,6-ТРИНИТРОТОЛУОЛА НА ШТАММЫ *ESCHERICHIA COLI*

03.00.07 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань - 2006

Работа выполнена в лаборатории инженерной энзимологии кафедры микробиологии ГОУВПО “Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина”

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор
Куриненко Борис Михайлович

Официальные оппоненты:

кандидат биологических наук, старший
преподаватель КГМА
Кипенская Лариса Викторовна
(Казанская медицинская академия,
г. Казань)

доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
Галина Ивановна Эль-Регистан
(Институт микробиологии РАН,
г. Москва)

Ведущая организация:

Казанский институт биохимии и биофизи-
ки РАН, г. Казань

Защита состоится _____ 2006 г в ____ на заседании диссертационного совета Д.212.081.08 при Казанском государственном университете им. В.И. Ульянова-Ленина, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского государственного университета.

Автореферат разослан _____ 2006 г.

И.о. ученого секретаря
диссертационного Совета,
доктор биологических наук

З.И. Абрамова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Нитроароматические соединения традиционно используют в качестве взрывчатых веществ и сырья для производства красителей, синтетических полимеров и растворителей. Они известны так же как избирательно действующие лекарственные препараты и пестициды. Большинство из них высокотоксичные и трудноразлагаемые неприродные соединения, относящиеся к числу экологически опасных веществ.

Одним из представителей полинитроароматических соединений является 2,4,6-тринитротолуол (ТНТ) - вещество, отличающееся выраженными токсическими свойствами и устойчивостью к биodeградации. Как следствие деятельности военных отраслей промышленности и военных объектов в различных регионах мира выявлены большие территории, загрязненные остатками взрывчатых смесей, основным компонентом которых является ТНТ [Fernando et al., 1990; Comfort et al., 1995; Scheibner et al., 1997]. С увеличением уровня производства ТНТ, вызванного потребностями военных, возрастает значение ремедиации мест производства ТНТ, оказывающего вредное влияние на окружающую среду.

В настоящее время наряду с физическими и физико-химическими способами детоксикации отходов, загрязненных ТНТ, разрабатываются подходы для их биоремедиации с использованием микроорганизмов: грибов [Fernando et al., 1990; Hawari et al., 1999], анаэробных [Boopathy, Kulpaing, 1992; Boopathy et al., 1993] и аэробных бактерий [Наумова с соавт., 1979; Наумова с соавт., 1988; Boopathy et al., 1994; Kalafut et al., 1998]. Механизм биотрансформации ТНТ аэробными и аэротолерантными микроорганизмами интенсивно исследуется [Boopathy et al., 1994; Fuller, Manning, 1997; French et al., 1998; Kalafut et al., 1998; Наумов с соавт., 1998, 1999; Hawari et al., 2000; Esteve-Nunez et al., 2001; Зарипов с соавт., 2002; Zaripov et al., 2002].

Известно, что аэробные грамотрицательные и грамположительные бактерии различаются по чувствительности к токсическому действию ТНТ [Наумова с соавт., 1982 а] и по стратегии трансформации ксенобиотика [Kalafut et al., 1998]. Отмечается высокая устойчивость к токсическому действию ксенобиотика у грамотрицательных микроорганизмов по сравнению с грамположительными. Вероятно, это является причиной преобладания грамотрицательных бактерий в почвах загрязненных ксенобиотиком. Механизм такой устойчивости может быть обусловлен различными причинами. В том числе наличием в структуре клеточной стенки внешней липопротеидной мембраны (ВЛПМ), выполняющей функцию дополнительного защитного барьера клетки и препятствующего одномоментному поступлению в клетку высоких концентраций ксенобиотика. Однако известно, что стабильность и проницаемость ВЛПМ штаммов грамотрицательных видов может существенно разли-

чаться. Следствием этого возможны внутривидовые отличия в устойчивости штаммов к токсическому действию ксенобиотиков, в том числе и ТНТ. Нельзя исключить, что подобные различия могут сказаться и на особенностях стратегии трансформации ксенобиотика устойчивыми и чувствительными штаммами. В частности, стратегия трансформации чувствительными штаммами грамотрицательных бактерий может быть зависима от токсического действия ксенобиотика, подобно стратегии, описанной нами ранее для аэробной *Bacillus subtilis SK1*, чувствительной к токсическому действию ТНТ. Несмотря на привлекательность высказанных предположений, мы не нашли их экспериментального подтверждения.

Токсическое действие различных веществ может не только подавлять жизнеспособность микроорганизмов, но и вызывать их адаптацию к новым условиям существования, механизмы которой могут быть разнообразными. В основе адаптации микроорганизмов к токсическим веществам нередко лежит использование как специальных ферментов детоксикации, так и различных ферментных систем обмена веществ клетки. Количество и последовательность использования ферментных систем обмена веществ клетки для детоксикации будут зависеть от совокупности их свойств и, в частности, от устойчивости ферментов к инактивирующему (ингибирующему) действию ксенобиотика и от значения каталитической константы в реакциях превращения ксенобиотика как субстрата. Исходя из этого, логично предположить, что концентрация ТНТ может оказать решающее значение на его трансформацию той или иной ферментной системой клетки, что, возможно, и определяет особенности так называемой стратегии трансформации. Адаптационные процессы к неблагоприятным условиям среды обитания не ограничиваются реакциями детоксикации, а затрагивают целый ряд морфофизиологических показателей клеток [Пронин с соавт., 1982; Мулюкин с соавт., 1996; Мулюкин с соавт., 1997; Мулюкин, 1998; Головлев, 1998; Куриненко с соавт., 2003]. Влияние высоких концентраций ТНТ на адаптационные изменения метаболизма и морфофизиологические показатели клеток грамотрицательных бактерий – деструкторов практически не исследованы, несмотря на то, что такие исследования имеют несомненное теоретическое и практическое значение.

Цель и задачи исследования. В связи с выше изложенным, цель работы - установить различия в чувствительности к токсическому действию 2,4,6- тринитротолуола штаммов *Escherichia coli*, отличающихся барьерными свойствами внешней липопротеидной мембраны, и оценить адаптационные изменения штамма *Escherichia coli*, способного к полной элиминации ксенобиотика, в ответ на токсический стресс.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие задачи

исследования:

1. Разработать метод определения барьерных свойств внешней липопротеидной мембраны грамотрицательных бактерий. Провести сравнение барьерных свойств внешней липопротеидной мембраны исследуемых штаммов *Escherichia coli*.

2. Оценить способность штаммов, различающихся стабильностью и проницаемостью внешней липопротеидной мембраны, к деструкции ксенобиотика.

3. Определить влияние различных концентраций 2,4,6-тринитротолуола на изменение стратегии его трансформации штаммами *Escherichia coli*, различающимися стабильностью и проницаемостью внешней липопротеидной мембраны.

4. Используя традиционные методы микробиологических исследований и проточную цитофлуориметрию установить характер воздействия высоких концентраций 2,4,6-тринитротолуола на морфофизиологические свойства клеток штамма *Escherichia coli* K12, способного к полной элиминации ксенобиотика.

Научная новизна работы. Разработан метод оценки барьерных свойств ВЛПМ грамотрицательных бактерий, основанный на различии в чувствительности штаммов *E. coli* к анионному поверхностно активному веществу - натриевой соли ди-2-этилгексилового эфира сульфоянтарной кислоты (Аэрозоль ОТ, АОТ) и основному фуксину.

Впервые установлено, что штаммы одного и того же вида грамотрицательных бактерий, различающиеся по чувствительности к токсическому действию ксенобиотика, адаптируются к токсическим концентрациям, используя как стратегию нитровосстановления, так и денитритации. С увеличением концентрации ксенобиотика происходило изменение стратегии его трансформации с образования продуктов нитровосстановления на образование нитритов, как у изученной ранее грамположительной *B. subtilis* SK1, чувствительной к токсическому действию ТНТ [Куриненко с соавт., 2003].

Впервые установлено, что изменение стратегии трансформации ксенобиотика различными штаммами одного и того же вида грамотрицательных бактерий, различающихся барьерными свойствами внешней липопротеидной мембраны, зависит от концентрации ТНТ. Смена образования продуктов нитровосстановления на продукты денитритации происходит при более низкой концентрации ксенобиотика у штамма, обладающего менее стабильной и более проницаемой ВЛПМ.

Впервые, на примере штамма *E. coli* K12, обладающего наиболее стабиль-

ной и наименее проницаемой внешней липопротеидной мембраной, установлено, что действие высокой концентрации ТНТ(200мг/л) в аэробных условиях сопровождается изменением морфологических показателей клеток: уменьшением размеров, увеличением их плотности и изменением морфологии части клеток популяции с палочковидной на кокковидную.

Впервые, с помощью метода проточной цитофлуориметрии, установлено, что ТНТ оказывает ингибирующее действие на механизмы, ответственные за энергетический статус клеток *E. coli*, что проявляется в снижении их трансмембранного потенциала ($\Delta\psi$).

Впервые также установлено различие в так называемом энергетическом профиле популяции - в количественном распределении клеток популяций контроля и «ТНТ-клеток» по значению $\Delta\psi$. В обеих популяциях, в зависимости от фазы роста в контроле и концентрации ТНТ в «ТНТ-клетках», имелись субпопуляции с высоким и низким значением $\Delta\psi$. В контроле бимодальное распределение клеток по значению $\Delta\psi$ имело место в лаг-фазе и при переходе в стационарную фазу роста. Для «ТНТ-клеток» бимодальное распределение по значению $\Delta\psi$ определялось во всем диапазоне высоких концентраций ТНТ.

Научно-практическая значимость работы. В данной работе представлены доказательства того, что изменение стратегии трансформации ТНТ зависящее от концентрации ксенобиотика и впервые описанное нами для аэробной грамположительной *B. subtilis SK1* [Куриненко с соавт., 2003], получило подтверждение для грамотрицательной *E. coli*. Это обосновывает необходимость выяснения механизма переключения стратегии нитровосстановления на денитритацию и выяснения молекулярного механизма денитритации, который до сих пор не известен. Знание деталей этих механизмов представляет интерес для фундаментальной науки, в частности раздела, изучающего регуляцию метаболизма микроорганизмов в экстремальных условиях жизнеобеспечения.

Установлено, что ТНТ в токсических концентрациях вызывает структурно-функциональные перестройки клеток *E. coli*, что проявляется в уменьшении размеров, и увеличении удельной плотности, подавлении аккумуляции энергии. Эти перестройки обратимы и со снижением концентрации ксенобиотика происходит нормализация морфофизиологических показателей клеток. Эти данные имеют практическое значение. Их целесообразно учитывать при определении кинетических параметров роста бактерий в условиях токсического стресса. Пренебрежение этими данными при определении кинетических параметров роста бактерий, культивируемых в условиях токсического стресса, может привести к некорректным выводам, если эти параметры сформулированы на основе оптической плотности культуры.

Переключение стратегии трансформации ТНТ имеет не только научное, но и практическое значение. Его необходимо учитывать при использовании аэробных грамотрицательных бактерий или сообщества микроорганизмов для биodeградации отходов, содержащих ксенобиотики.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Вид *E. coli* демонстрирует высокую вариабельность барьерных свойств внешней липопротеидной мембраны.

2. Штамм *E. coli K12* со стабильной внешней липопротеидной мембраной по сравнению со штаммом *E. coli 055* с более проницаемой и менее стабильной ВЛПМ обладает способностью к более быстрой и полной элиминации ТНТ из среды культивирования.

3. Токсическое действие ТНТ по отношению к шт. *E. coli K12* проявляется в диссоциации культуры на две жизнеспособные субпопуляции, характеризующиеся выраженными морфологическими и физиолого-биохимическими отличиями.

4. Клетки *E. coli K12*, культивируемые в присутствии высоких концентраций ТНТ, отличается более мелкими размерами, увеличением удельной плотности, повышенной проницаемостью ВЛПМ.

5. Высокая концентрация ТНТ приводит к снижению скорости утилизации глюкозы штаммом *E. coli K12*, уменьшению в клетках штамма количества восстановленных никотинамидадениндинуклеотидов и увеличению восстановленных флавопротеидов.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Работа в течение 2001-2005гг. проводится в соответствии с планом НИР Казанского государственного университета «Молекулярные механизмы ответа клетки на раздражение. Влияние природы и силы раздражителя, функционального состояния клетки и степени ее дифференцированности на содержание клеточного ответа» (№ гос. регистрации 01.2.00.1.15733, научный руководитель д.б.н. проф. Б.М. Куриненко). Постановка задачи диссертационного исследования принадлежит научному руководителю работы д.б.н. проф. Б.М. Куриненко. Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора. Трансмембранную разность электрических потенциалов (трансмембранный потенциал – $\Delta\psi$) бактерий, проницаемость внутренней плазматической мембраны, прямое светорассеяние FSC (показатель размера клетки) и боковое светорассеяние SSC (показатель гранулярности цитоплазмы) определяли совместно с д.м.н. проф. Г.В. Черепневым и врачом-лаборантом Т.А. Велижинской, на проточном цитофлуориметре FacsCalibur (*Becton Dickinson*, USA) на базе лаборатории иммунологии Республиканской Клинической Больницы № 2 Министерства Здравоохранения Республики Татарстан. Определение количества окисленных и восстановленных кофакто-

ров проводили совместно с к.б.н. Р.Э. Давыдовым на спектрофлуориметре «SIGNE - 4М» на базе лаборатории инженерной энзимологии Казанского Государственного Университета им. В.И. Ульянова-Ленина.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на итоговых научных конференциях КГУ (Казань, 2001, 2002, 2003, 2004), школах-конференциях молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пущино, 2003, 2004), XII и XIII юбилейной конференции «Ферменты микроорганизмов» (Казань, 2001, 2005).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 научных работ.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность: научному руководителю доктору биологических наук профессору Б.М. Куриненко, за чуткое руководство; кандидату биологических наук Г.Ю. Яковлевой за поддержку, помощь в выполнении и внимательное отношение к работе; кандидату биологических наук Р.Э. Давыдову за определение количества окисленных и восстановленных кофакторов и участие в обсуждении результатов; доктору медицинских наук Г.В. Черепневу и врачу-лаборанту Т.А. Велижинской; за возможность осуществления цитофлуориметрии на базе лаборатории иммунологии РКБ №2 МЗ РТ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела экспериментальных исследований и обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 109 страницах машинописного текста, включает 4 таблицы, 18 рисунков. Библиография содержит 173 источника, из них 120 зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Микроорганизмы, среды и условия культивирования

Объектом исследования служили штаммы *E. coli* K12, *E. coli* 055, *E. coli* 020, *E. coli* 25927, *E. coli* B12, *E. coli* 0124, *E. coli* K2KS, *E. coli* 209, *E. coli* 168, *E. coli* 026 из коллекции музея Казанской государственной медицинской академии.

Инокулят выращивали в колбах на 100 мл на мясопептонном бульоне (МПБ) 16-18 ч при 30⁰С в условиях принудительной аэрации и вносили в среду до конечной концентрации $3,4 \cdot 10^7$ клеток/мл. Культивирование вели в колбах на 250 мл на качалке при 120 об./мин на синтетической среде следующего состава (г/л): (NH₄)₂SO₄ – 0.5; MgSO₄·7H₂O – 0.25; NaCl – 0.5; глюкоза – 3.0; ТНТ - 0.2; фосфатный буфер (0.2 М KH₂PO₄ / Na₂HPO₄, pH 7.0)- 4 % (об./об.).

ТНТ, предварительно растворенный в этаноле, вносили перед автоклавированием в подогретую до 80⁰С среду до конечной концентрации 20 - 200 мг/л.

2. Микробиологические методы

2.1. Определение концентрации биомассы. Концентрацию биомассы опреде-

ляли нефелометрическим методом, измеряя светорассеяние, вызываемое суспензией клеток микроорганизмов, на фотоколориметре КФК-2-УХЛ4.2 с красным световым фильтром, при длине волны 670 нм [Методы общей бактериологии, 1983].

2.2. Подсчет общего количества бактериальных клеток. Подсчет велся в счетной камере Горяева-Тома [Методы общей бактериологии, 1983].

2.3. Определение количества живых клеток микроорганизмов. Жизнеспособность определяли путем посева на плотные питательные среды и подсчета числа колониеобразующих единиц (КОЕ) [Методы общей бактериологии, 1983].

2.4. Микроскопическое наблюдение. Проводили с помощью микроскопа Carl Zeiss Jena (ГДР) с фазово-контрастным устройством. Фотографировали цифровой фотокамерой *NIKON Coolpix S1* с использованием иммерсионной системы, с объективом $\times 100$, и окуляром $\times 15$.

2.5. Определение размеров клеток. Определение размеров клеток популяции проводили с помощью микроскопа Carl Zeiss Jena (ГДР) и окулярного винтового микрометра МОВ-1-15X [Методы общей бактериологии, 1983].

2.6. Определение показателя преломления бактериальных клеток. Для расчета удельной плотности клеток использовали фотометрическое определение показателя преломления бактерий экстраполяционно-графическим методом [Фихман, 1967].

2.7. Определение барьерных свойств внешней липопротеидной мембраны (ВЛПМ). Барьерные свойства ВЛПМ оценивали по разнице в КОЕ, выросших на мясопептонном агаре (МПА) и МПА с добавлением фуксина в концентрации аналогичной его количеству в дифференциально-диагностической среде Эндо (0,2 г/л), а также по разнице в КОЕ, выросших на МПА и МПА с АОТ в концентрации $10^{-3} \%$ и МПА с АОТ в той же концентрации, но с добавлением фуксина [Оригинальный метод автора].

3. Химические и биохимические методы

3.1. Определение эффективности трансформации ТНТ. Эффективность трансформации оценивали по убыванию концентрации ТНТ в культуральной жидкости. Для определения ТНТ использовали метод, основанный на цветной реакции ТНТ с Na_2SO_3 в щелочных условиях [Лурье, Рыбникова, 1974].

3.2. Интегральная оценка количества продуктов нитровосстановления (ПНВ). Суммарное количество ПНВ определяли с помощью цветной реакции с п-диметиламинобензальдегидом по методике, описанной Наумовой с соавт. [1983].

3.3. Выделение и идентификация метаболитов трансформации ТНТ. Идентификацию продуктов превращения ТНТ проводили, сравнивая величины R_f в двух системах растворителей с аналогичными параметрами метчиков, синтезированных и

предоставленных Наумовым А.В.: 2-амино-4,6-динитротолуол (2-А), 4-амино-2,6-динитротолуол (4-А) и 2,4-диамино-6-нитротолуол (2,4-ДА).

3.4. Определение количества нитритов. Определение проводили по общепринятой методике с реактивом Грисса [Hanson, Phillips, 1981].

3.5. Определение концентрации глюкозы. Определение осуществляли ферментативным методом [Bergmeyer et al., 1974].

3.6. Определение количества окисленных и восстановленных кофакторов. Определение проводили спектрофлуориметрически [Лукьянова с соавт., 1982; Harrison, Chance, 1970] на спектрофлуориметре «SIGNE - 4М» (г. Рига).

4. Метод проточной цитофлуориметрии

Трансмембранную разность электрических потенциалов (трансмембранный потенциал - $\Delta\psi$) бактерий, прямое светорассеяние FSC (показатель размера клетки) и боковое светорассеяние SSC (показатель гранулярности цитоплазмы) [Muller et al., 2000], проницаемость плазматической мембраны [Herrera et al., 2002] определяли на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, USA).

5. Статистическая обработка результатов

Математическую обработку данных проводили в стандартной компьютерной программе «Microsoft Excel». В работе все эксперименты были проведены не менее чем в пяти повторностях. Группу данных считали однородной, если среднеквадратическое отклонение σ в ней не превышало 13 %. Различие между группами считали достоверным при критерии вероятности $P < 0,05$.

Результаты проточной цитофлуориметрии анализировали на рабочей станции Macintosh Quadra 650 в программе Cell Quest (Becton Dickinson) с применением статистики Колмогорова-Смирнова. Для корректного сопоставления $\Delta\psi$ в клетках неодинакового размера сравнивали только нормированные «сигнал минус шум»-гистограммы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка барьерных свойств внешней липопротеидной мембраны штаммов *E. coli*. Для оценки барьерных свойств внешней липопротеидной мембраны (ВЛПМ) исследуемых штаммов *E. coli* мы использовали различие в их чувствительности к АОТ [Hancock et al., 1984; Tomlins et al., 1972] и основному фуксину.

С этой целью мы сравнивали способность различных штаммов *E. coli* расти на МПА содержащем фуксин в концентрации 0,2 г/л, 0,5 г/л, 1 г/л и на средах, содержащих фуксин 0,2 г/л и АОТ в концентрации 10^{-1} %, 10^{-3} %, 10^{-5} %. С помощью этих тестов был проведен скрининг 10 штаммов *E. coli*. Из них было отобрано два штамма - *E. coli* K12 и *E. coli* 055.

Как видно из рис. 1, фуксин вплоть до концентрации 2 г/л не оказывал влияния на количество КОЕ штамма *E. coli* K12. Количество КОЕ штамма *E. coli* 055

достоверно уменьшалось, начиная с концентрации 0,2 г/л, а при 1-2 г/л полностью подавлялось.

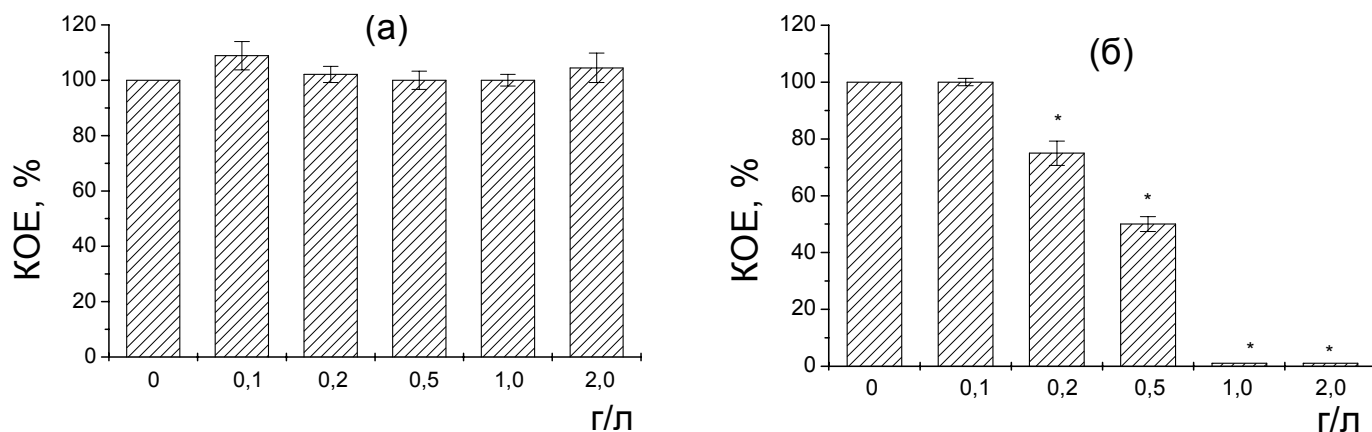


Рис.1. Количество колониеобразующих единиц клеток *E. coli* штаммов K12 (а) и 055 (б), выросших на МПА с различной концентрацией фуксина (г/л). За 100 % принимали количество КОЕ выросших на МПА без фуксина. На этом и на последующих рисунках достоверные отличия от контроля ($P < 0.05$) обозначается *.

Добавление к МПА с фуксином (0,2 г/л) АОТ в концентрациях от $10^{-5}\%$ до $10^{-1}\%$ (рис. 2) не влияло на количество КОЕ штамма *E. coli* K12, но оказывало синергидный с фуксином подавляющий эффект на клетки штамма *E. coli* 055.

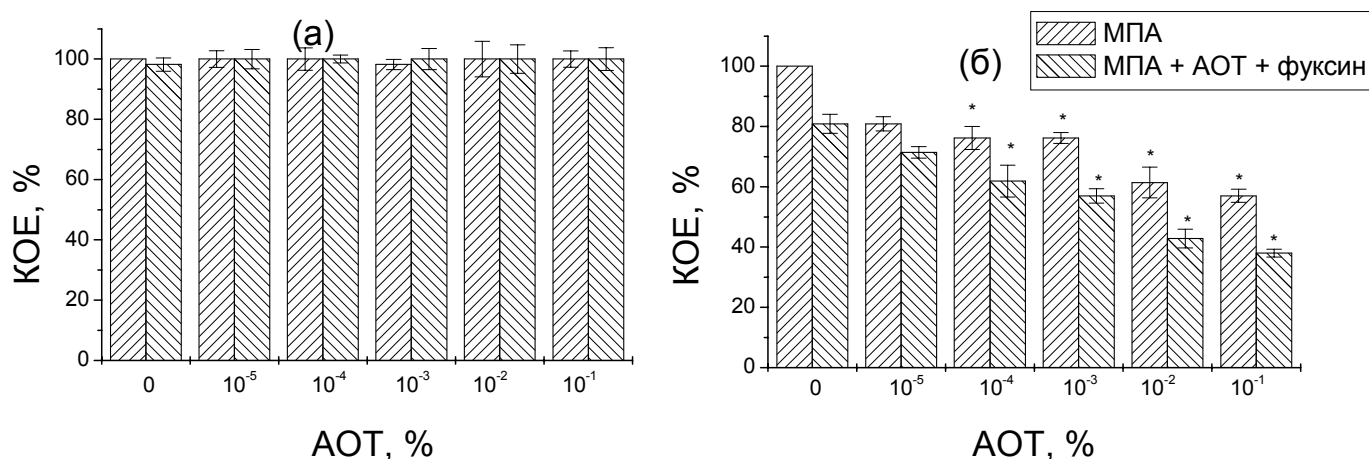


Рис. 2. Количество колониеобразующих единиц клеток *E. coli* штаммов K12 (а) и 055 (б), выросших на МПА и на МПА с фуксином (0,2 г/л) в присутствии различных концентраций АОТ. За 100 % принимали количество КОЕ выросших на МПА без фуксина и АОТ.

Влияние ТНТ на рост и деструктивные свойства *E. coli* K12 и *E. coli* 055

В экспериментах использовался широкий диапазон концентраций ТНТ - от 20 мг/л до 200 мг/л. Штамм *E. coli* K12 в присутствии высоких концентраций ксено-

биотика способен расти на среде с ТНТ во всем диапазоне исследуемых нами концентраций нитроарила, и к 8ч культивирования оптическая плотность культур в опытных вариантах вплоть до концентрации 200 мг/л достоверно не отличалась от контроля (рис.3 а).

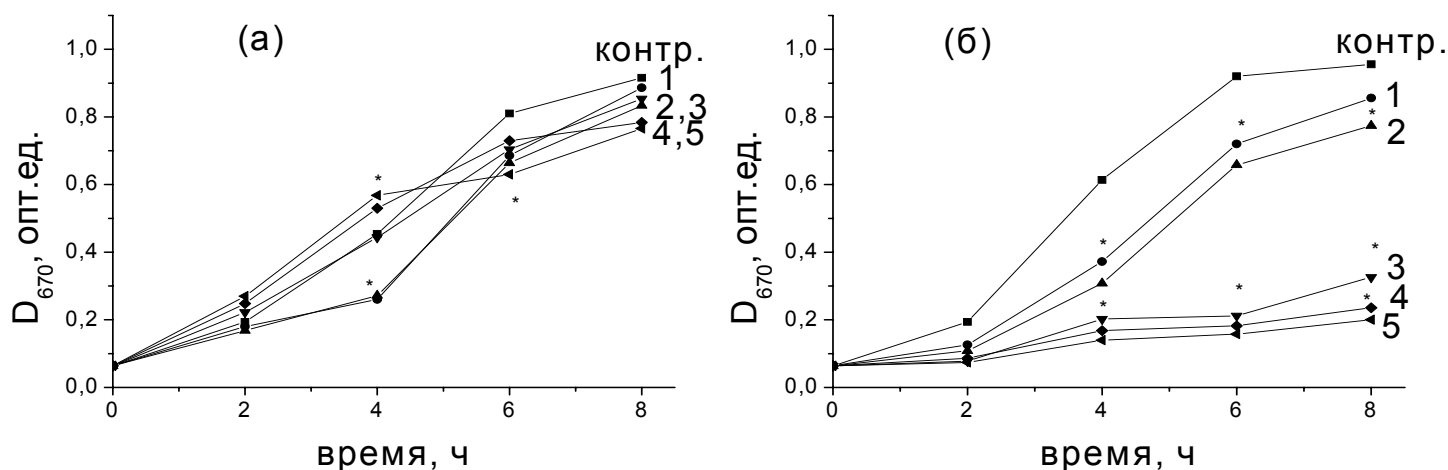


Рис. 3. Динамика роста клеток *E. coli* штаммов K12 (а) и 055 (б) на синтетической среде с различными концентрациями ТНТ: 1 - 20 мг/л; 2 - 50 мг/л; 3 - 100 мг/л; 4 - 150 мг/л; 5 - 200 мг/л.

Штамм *E. coli* K12 к 8ч полностью элиминировал ТНТ из среды культивирования с исходной концентрацией 20 мг/л, 50 мг/л и 100 мг/л, и на 94 % и 83 % при начальной концентрации 150 мг/л и 200 мг/л соответственно.

Внесение ксенобиотика в среду культивирования оказывало ингибирующее действие на рост *E. coli* 055 (рис.3 б). При внесении в среду культивирования ТНТ в концентрации 20 мг/л и 50 мг/л, рост *E. coli* 055 наблюдался на 4ч культивирования, когда ксенобиотик в среде практически не определялся. Штамм *E. coli* 055, как и описанная нами ранее *B. subtilis* SK1 [Куриненко с соавт., 2003], элиминировал ксенобиотик из среды культивирования, при исходной концентрации 20 мг/л и 50 мг/л в значительно меньшей степени чем *E. coli* K12, то же касается и концентрации 100 мг/л, 150 мг/л и 200 мг/л.

Ранее мы высказали предположение о том, что в метаболической адаптации микроорганизмов к токсическому действию ксенобиотиков значительную роль может играть смена ферментных систем детоксикации [Куриненко с соавт., 2003]. Основываясь на этом предположении, мы определили особенности стратегии трансформации ТНТ двумя штаммами *E. coli*, определив природу образующихся продуктов нитровосстановления и способность к образованию нитритов.

Как видно из рис. 4, при концентрациях ксенобиотика до 50 мг/л для штамма *E. coli* 055 и до 100 мг/л для *E. coli* K12 происходила трансформация ТНТ с образованием ПНВ. При дальнейшем увеличении концентрации ТНТ количество ПНВ снижалось, и в среде начинали накапливаться нитриты. То есть оба штамма способны трансформировать ТНТ, используя стратегию нитровосстановления и денитритации ксенобиотика.

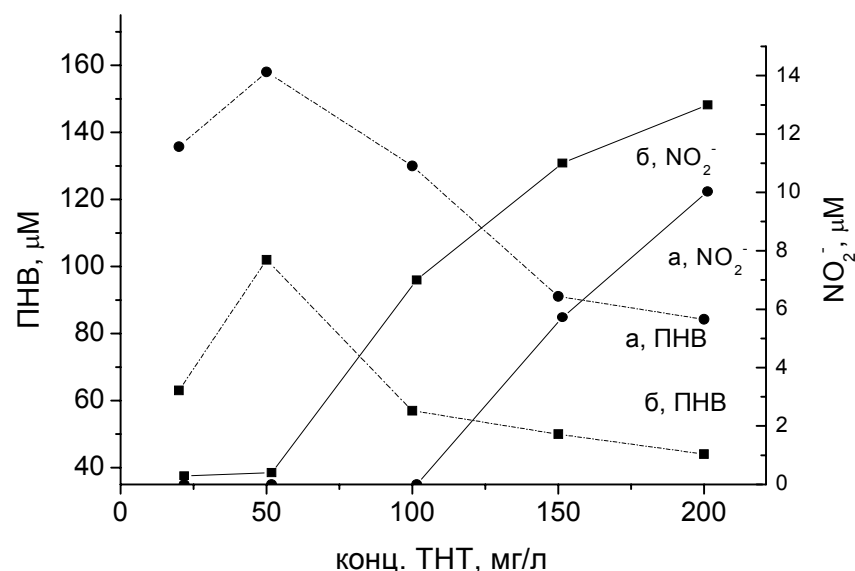


Рис. 4. Динамика образования продуктов трансформации ТНТ через 8ч культивирования *E. coli* штаммов K12 (а) и 055 (б) на синтетической среде с различными концентрациями ксенобиотика.

Представленные нами данные свидетельствуют о том, что различные штаммы одного и того же вида грамотрицательных бактерий могут различаться по чувствительности к токсическому действию ТНТ. Они способны адаптироваться к токсическим концентрациям ТНТ, используя как стратегию нитровосстановления, так и денитритации ксенобиотика, как и ранее изученная нами *B. subtilis* SK1 [Куриненко с соавт., 2003]. Более высокая чувствительность к токсическому действию ТНТ клеток штамма *E. coli* 055 и переключение метаболизма со стратегии нитровосстановления на денитритацию при более низких концентрациях ксенобиотика по сравнению со штаммом *E. coli* K12, находятся в соответствии с нарушением барьерной функции его ВЛПМ. А переключение стратегии трансформации у обоих штаммов с увеличением концентрации ТНТ является доказательством роли токсического пресса в этом переключении. Очевидно, что переключение стратегии трансформации ТНТ штаммом *E. coli* K12 с образования ПНВ на денитритацию, свидетельствует о подавлении ксенобиотиком системы редукции, что следует рассматривать как проявление токсического действия ТНТ в отношении и

денитритации ксенобиотика. Вместе с тем, система редукции, ответственная за образование ПНВ, у клеток штамма *E. coli* 055 инактивировалась раньше, чем у штамма *E. coli* K12. Соответственно в процесс трансформации ТНТ у штамма *E. coli* 055 раньше, чем у штамма *E. coli* K12 включалась система денитритации ксенобиотика.

этого штамма *E. coli*.

Ранее нами было показано, что адаптационные механизмы чувствительной к токсическому действию ТНТ *B. subtilis SK1*, наряду с переключением стратегии нитровосстановления на денитритацию ксенобиотика, также включают в себя целый ряд морфофизиологических изменений клеток [Куриненко с соавт., 2003]. Следует ожидать, что подобные изменения либо отсутствуют, либо носят другой характер у бактерий, способных трансформировать высокие концентрации ксенобиотика. Учитывая это обстоятельство, дальнейшая работа велась со штаммом *E. coli K12*, с использованием ТНТ в концентрации 200 мг/л.

Влияние ТНТ на морфологию и размеры клеток *E. coli K12*. Мы определили интенсивность роста *E. coli K12*, оценивая его по изменению D_{670} , общему количеству клеток и количеству колониеобразующих клеток (КОЕ) культуры в присутствии 200 мг/л ТНТ.

Полученные данные свидетельствуют о том, что D_{670} культуры в присутствии ТНТ на 2ч и 4ч роста были выше, чем в контроле, и становились равными контролю, начиная с 6ч культивирования (рис.5 а). Более высокие значения D_{670} отмечались при высоких концентрациях ТНТ в среде культивирования (100 - 150 мг/л). Снижение D_{670} в опыте до значений в контроле происходило при значительном снижении концентрации ксенобиотика до 18 ± 2 мг/л и ниже.

В отличие от D_{670} , общее количество клеток в контроле в течение всего времени культивирования достоверно превышало количество клеток в опыте. Это же относилось и к количеству КОЕ (рис. 9 б).

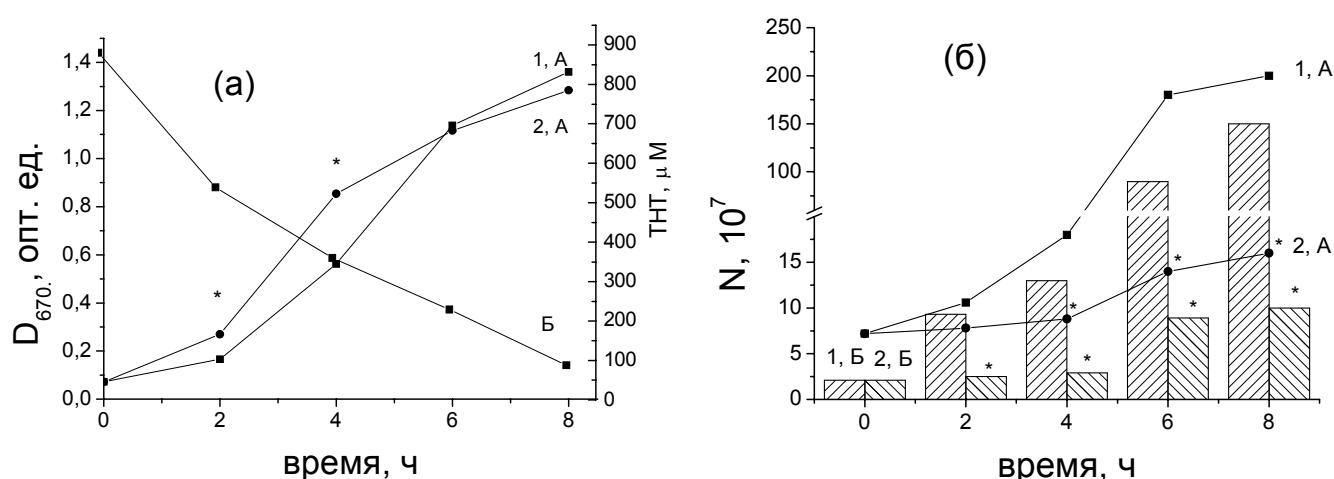
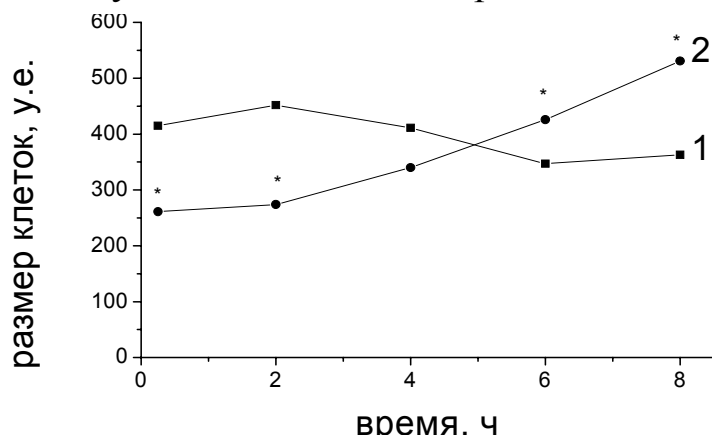


Рис. 5. а- рост *E. coli K12* в единицах D_{670} (А) и изменение концентрации ТНТ (Б): 1,А – без ТНТ; 2,А – с ТНТ (200 мг/л); б - общее количество (А) и количество колониеобразующих клеток (Б) *E. coli K12*: 1 – без ТНТ; 2 – с ТНТ (200 мг/л).

Таким образом, увеличение D_{670} культуры *E. coli* K12, растущей в присутствии высоких концентраций ТНТ, не было связано с увеличением количества клеток, а вероятнее всего, как и в случае с *B. subtilis* SK1 [Куриненко с соавт., 2003], связано с изменением морфологии или физических свойств клеток.

Микроскопическое исследование показало, что в контроле клетки сохраняли палочковидную форму и подвижность в течение всего срока культивирования. На фиксированных окрашенных препаратах они были представлены в виде одиночных палочек или коротких цепочек. Клетки, растущие в присутствии ТНТ («ТНТ-клетки») претерпевали морфологические изменения. Начиная со 2ч культивирования, клетки были представлены двумя формами: 85-90% - палочки, хорошо окрашивались фуксином, как и клетки в контроле, и 10-15% - круглые (кокковидные) клетки, мельче контрольных в нативных препаратах, мало подвижны и хорошо преломляли свет. К 4ч количество палочковидных форм значительно снижалось и составляло 25-30%, а количество кокковидных форм возрастало до 70-75%. Палочковидные формы «ТНТ-клеток» преимущественно одиночны, тогда как в контроле наоборот, значительная часть клеток была представлена цепочками. К 6ч в среде с ТНТ было обнаружено 60-70% палочковидных форм клеток и 30-40% кокковидных. На 8ч в опытном варианте сохранялось около 5-10% кокковидных клеток, остальные 90-95% - палочковидные клетки и цепочки палочковидных клеток, хорошо окрашиваемых, подвижных.

Наряду с изменением формы, клетки опытных вариантов отличались от контроля своими размерами. Размер клеток оценивали микрометрически, а также методом проточной цитометрии. Полученные при этом результаты совпадают. На рис. 6 представлены данные по изменению размеров клеток, полученные методом проточной цитометрии. Размер контрольных клеток



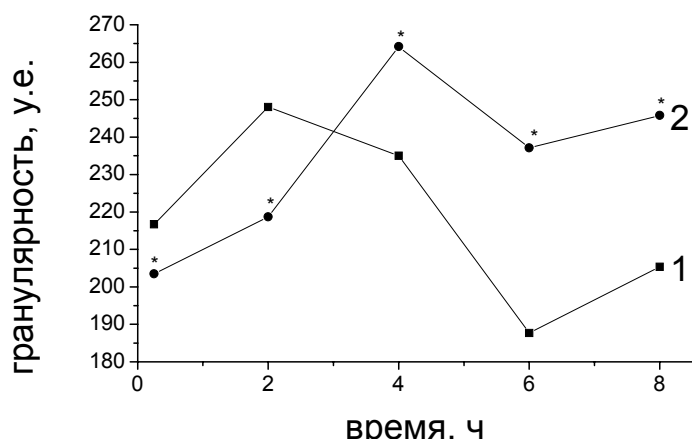
уменьшается лишь к 8ч культивирования. «ТНТ-клетки» уже через 15 мин. культивирования при сохранении палочковидной формы становились мельче контрольных, еще более уменьшаясь ко 2ч и 4ч культивирования, но к 6ч размер их несколько увеличивался и к 8ч превышал размер клеток в контроле.

Рис. 6. Изменение размеров клеток *E. coli* K12: 1 - без ТНТ; 2 - с ТНТ (200 мг/л). Данные полученные методом проточной цитометрии, представленные в условных единицах (у.е.).

Так как изменение морфологии и размеров «ТНТ-клеток» в процессе культивирования не подчинялось принципу «все или ничего» это свидетельствует о гетерогенности популяции *E. coli K12*. Эта гетерогенность проявлялась в различном отношении, по крайней мере, двух субпопуляций клеток к токсическому действию ТНТ. Вероятно, палочковидные формы «ТНТ-клеток», обнаруживаемые при микроскопическом исследовании, о чем говорилось ранее, по неизвестной причине более устойчивы к токсическому действию ксенобиотика.

Изменение показателя преломления и гранулярности клеток *E. coli K12*, культивируемых с ТНТ. Изменение морфологии и уменьшение размеров клеток не могли объяснить отмеченную выше неадекватность изменений оптической плотности и количества клеток *E. coli K12*, культивируемых в присутствии ТНТ (рис. 5 а,б).

В связи с этим представлялось необходимым определить показатель преломления клеток *E. coli K12*. Показатель преломления клеток контроля достигает максимума ко 2ч культивирования, после чего начинает снижаться. Показатель преломления «ТНТ-клеток» также увеличивается со 2ч, к 4ч достоверно превышая показатель преломления клеток контроля, достигая значений, которые сохраняются на 6 - 8ч культивирования. Подобное изменение показателя преломления бактериальных клеток, культивируемых в присутствии 200 мг/л ТНТ, наблюдалось и у исследуемой ранее *B. subtilis SK1*, культивируемой в аналогичных условиях [Куриненко с соавт., 2003]. Показателем, адекватным показателю светопреломления, при методе проточной цитометрии, является гранулярность (боковое светорассеяние) клетки (рис. 7).



Причиной увеличения показателя преломления, как и гранулярности, может быть увеличение концентрации клеточных макромолекул, конденсация внутриклеточных структур или появление новых внутриклеточных образований. Каждое из этих равновероятных изменений структуры клеток приводит к увеличению их оптической плотности.

Рис. 7. Изменение гранулярности клеток *E. coli K12*: 1 - без ТНТ; 2 - с ТНТ (200 мг/л). Данные полученные методом проточной цитометрии, представленные в условных единицах (у.е.).

Влияние ТНТ на проницаемость внешней липопротеидной мембраны (ВЛПМ) и плазматической мембраны клеток *E. coli* K12.

Морфофизиологические изменения клеток *E. coli* K12 в присутствии высоких концентраций ТНТ позволяют предположить, что они вызваны массивным поступлением ксенобиотика или продуктов его метаболизма к чувствительным к токсическому действию клеточным мишеням. В этом случае следовало ожидать ослабления барьерной функции внешней липопротеидной мембран и плазматической мембраны в процессе культивирования с ксенобиотиком. На рис.8 представлены результаты проверки этого предположения.

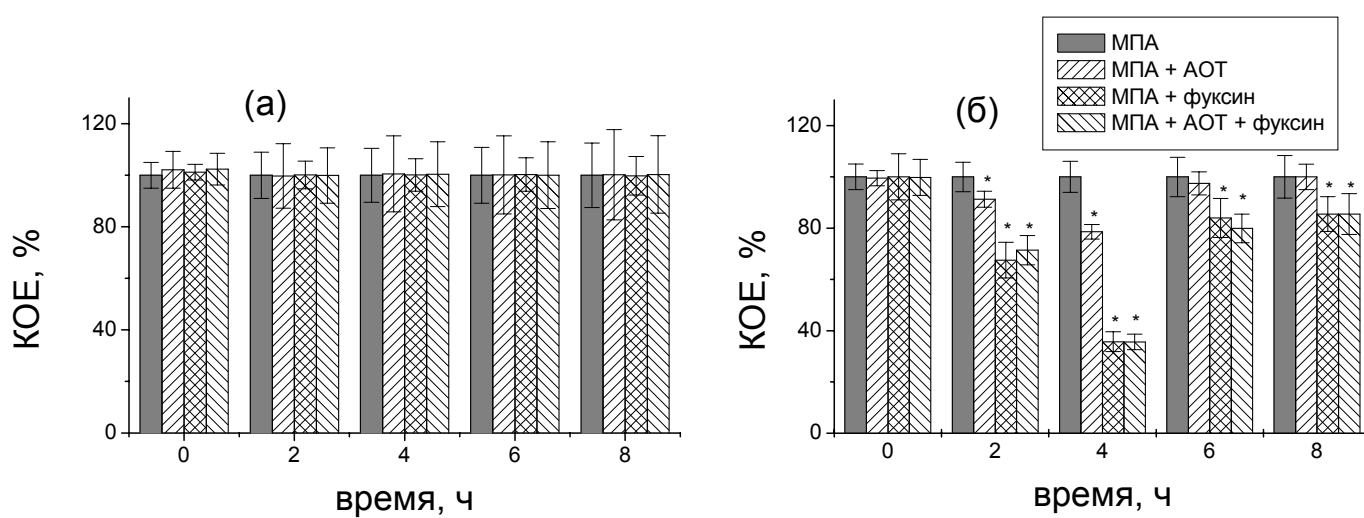


Рис. 8. Количество колониеобразующих единиц *E. coli* K12, выросших на МПА, МПА с АОТ (10^{-3} %), МПА с фуксином (0,2 г/л) и МПА с АОТ (10^{-3} %), и фуксином (0,2 г/л) (а - без ТНТ; б - с ТНТ (200 мг/л)). За 100 % принимали количество КОЕ, выросших на МПА.

Как видно из представленных данных в присутствии АОТ и фуксина количество КОЕ со 2ч культивирования с ТНТ уменьшалось по сравнению с контролем. Изменение чувствительности к фуксину у клеток, культивируемых в присутствии ТНТ, вызвано увеличением проницаемости ВЛПМ, однако появление чувствительности к АОТ не позволяет исключить и структурные перестройки ВЛПМ.

Так как нельзя исключить влияния ТНТ на проницаемость плазматической мембраны, мы оценили ее с помощью проточной цитофлуориметрии. Доля клеток контроля и «ТНТ-клеток», окрашенных пропидиум йодидом, - т.е. клеток с проницаемой плазматической мембраной, не превышает 2-4%.

Известно, что одним из критериев жизнеспособности клеток бактерий является целостность ее плазматической мембраны. Отсутствие влияния ксенобиотика (продуктов его метаболизма) на проницаемость плазматической мембраны свидетельствует о том, что клетки *E. coli* K12, несмотря на токсич-

ческое действие ксенобиотика, сохраняют жизнеспособность. Однако, увеличение 2,4,6-тринитротолуолом проницаемости ВЛПМ и отсутствие влияния ксенобиотика (продуктов его метаболизма) на проницаемость плазматической мембраны позволяют предположить, что мишень(и) действия ксенобиотика на клетку локализована(ы) в компартментах, ограниченных ВЛПМ и плазматической мембраной клетки.

Влияние ТНТ на содержание кофакторов клеток *E. coli* K12 культивируемых в присутствии ТНТ и на катаболизм глюкозы. Отмеченное ранее изменение стратегии трансформации высоких концентраций ТНТ *E. coli* K12 с образования продуктов нитровосстановления на продукты денитритации ксенобиотика вероятнее всего связано с нарушением функционирования системы ответственной за восстановление нитрогрупп ароматического кольца. В особенности с таким её элементом, как восстановленные кофакторы, необходимые для нитровосстановления ТНТ [Наумова с соавт., 1982a, Kalafut et al., 1998].

Влияние ТНТ на количество восстановленных никотинамидадениндинуклеотидов - НАД (НАДФ) - и окисленных флавопротеидов (ФП) - в «ТНТ-клетках» представлено на рис. 9. Динамика исследуемых кофакторов в контрольном варианте характерна для метаболизирующей культуры в период активного роста [Евтодиенко, Акименко, 1998]. Из рис. 9 следует, что количество восстановленных НАД (НАДФ) в «ТНТ клетках» значительно снижается после 4ч культивирования. Количество окисленных ФП также снижается, что свидетельствует об увеличении их восстановленных форм. Но поскольку это не приводило к смене стратегии трансформации ТНТ, увеличение количества восстановленных флавиновых нуклеотидов свидетельствует о том, что они не участвуют в образовании продуктов нитровосстановления.

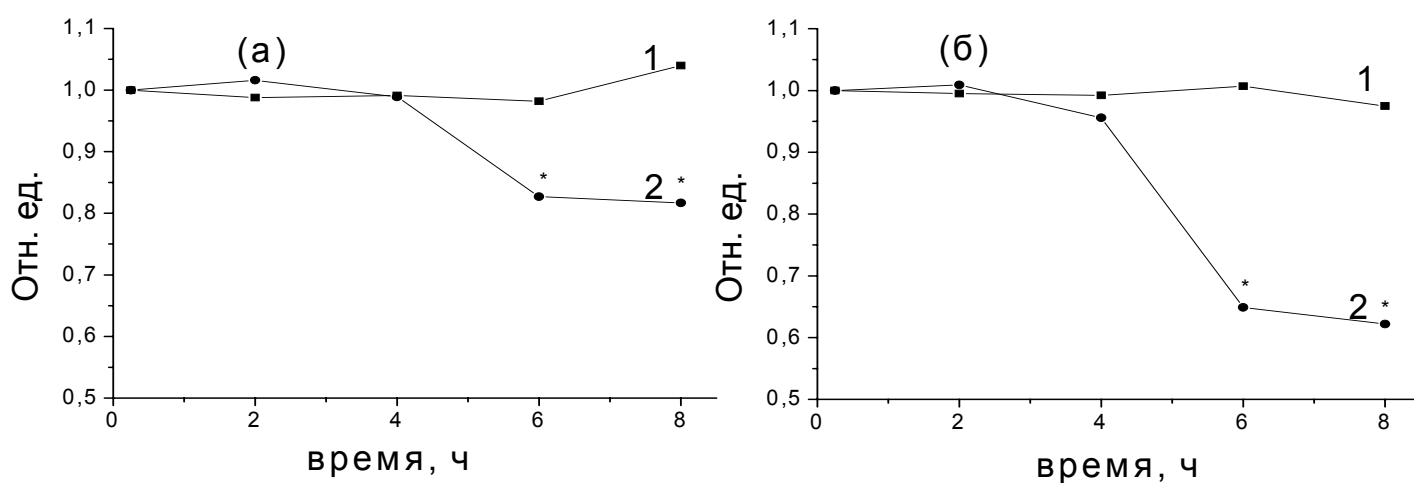


Рис. 9. Содержание восстановленных НАД (НАДФ) (а) и окисленных ФП (б) в клетках *E. coli* K12 на синтетической среде: 1 – без ТНТ; 2 – с ТНТ (200 мг/л).

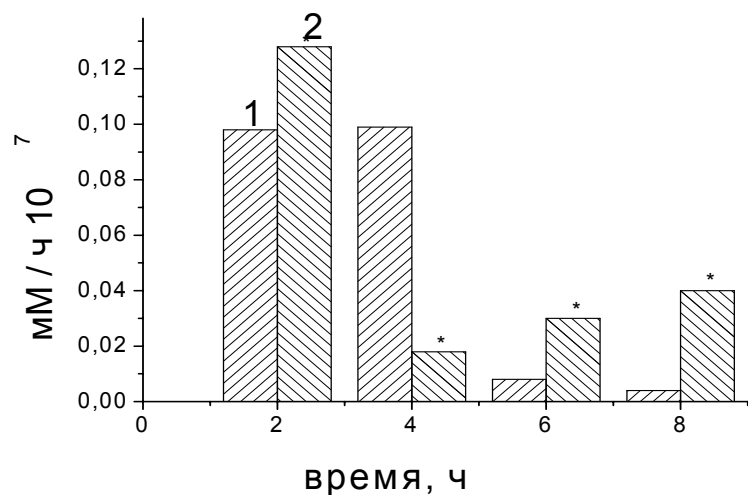


Рис. 10. Удельная скорость утилизации глюкозы *E. coli* K12: 1 - без TNT; 2 - с TNT(200 мг/л).

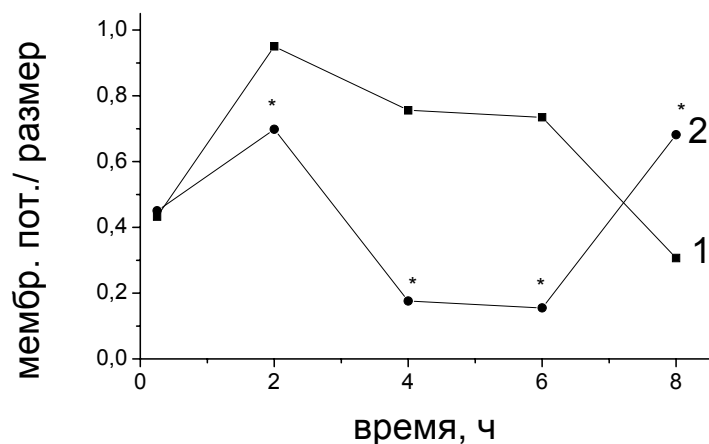
Падение удельной скорости утилизации глюкозы на 4ч совпадает с тем, что между 4ч и 6ч количество НАДН (НАДФН) (рис. 9 а) уменьшается. Это коррелирует со снижением скорости образования продуктов нитровосстановления TNT и свидетельствует о подавлении ключевых элементов системы редукции. Однако при этом продолжается процесс элиминации нитрогрупп ксенобиотика. Увеличение скорости утилизации глюкозы на 6ч не приводит к увеличению количества восстановленных НАД (НАДФ). Количество продуктов нитровосстановления практически не увеличивается. Однако при этом увеличивается как количество КОЕ, так и общее количество клеток (рис. 9 б). Вероятно, после уменьшения количества TNT (до 50 мг/л) интенсивно функционирующей системой денитритации ксенобиотика, остаточное количество восстановленных НАД (НАДФ) используется для обеспечения процессов, необходимых для деления и роста клеток.

Подавление 2,4,6-тринитротолуолом аккумуляции энергии и изменение энергетического профиля популяции клеток *E. coli* K12. Следствием подавления TNT восстановительных систем бактерий помимо подавления освобождения энергии в дыхательной цепи следует ожидать подавления работы $\Delta \mu_{\text{H}^+}$ - генераторов которые у *E. coli* представлены: НАДН (НАДФН) - CoQ - редуктазой и цитохром оксидазой [Скулачев, 1989]. Уменьшение $\Delta \mu_{\text{H}^+}$ сопровождается снижением трансмембранного потенциала $\Delta \psi$, которое можно определить с помощью потенциал-чувствительного флуорохрома 3,3'-дигексилоксакарбоцианин йодида (DiOC₆(3)).

На рис. 11 представлены данные по изменению значений $\Delta \psi$ в клетках контроля *E. coli* K12 и в клетках, культивируемых в присутствии TNT («TNT-клетках»).

Образование восстановленных кофакторов зависит от эффективности катаболизма глюкозы. На рис. 10 представлены данные по удельной скорости утилизации глюкозы. Более высокая скорость утилизации на 2ч культивирования по сравнению с контролем, вероятно, связана с использованием кофакторов для интенсификации процессов жизнеобеспечения клеток и максимальной скорости элиминации TNT.

В клетках контроля $\Delta\psi$ достигает максимального значения на 2ч культивирования, после чего начинает снижаться. Однако вплоть до 6ч его уровень сохраняет более



высокое значение по сравнению с клетками начала лаг-фазы. Только в клетках 8 часовой культуры $\Delta\psi$ становится ниже, чем в клетках начала лаг-фазы. ТНТ изменяет динамику $\Delta\psi$ клеток — на 2ч $\Delta\psi$, как и в контроле, увеличивается. Однако, если в клетках контроля это увеличение составляет 2,4 раза, то в «ТНТ-клетках» — 1,6. На 4ч и 6ч $\Delta\psi$ значительно ниже, чем в клетках начала лаг-фазы.

Рис. 11. Влияние ТНТ на мембранный потенциал *E. coli* K12, нормированный к размеру клеток: 1 - без ТНТ; 2 - с ТНТ(200 мг/л).

Представляет интерес факт неоднородности популяции клеток контроля и «ТНТ клеток» по значению $\Delta\psi$. В обеих популяциях имелись субпопуляции с более высоким значением $\Delta\psi$ (рис. 12; в левых пиках гистограмм $\Delta\psi$ -«низкие» клетки, в правых — $\Delta\psi$ -«высокие» клетки). В момент внесения инокулята как клетки контроля, так и «ТНТ-клетки» представляли собой клетки начала лаг-фазы. Таким образом, клетки начала лаг-фазы неоднородны по энергетическому статусу. Мы предположили, что в лаг-фазе к размножению готова лишь небольшая часть клеток — $\Delta\psi$ -«высокие» клетки, возможно они же и колониеобразующие клетки. При переходе популяции клеток в контроле к экспоненциальному росту (с 2ч по 6ч) соотношение между $\Delta\psi$ -«низкими» и $\Delta\psi$ -«высокими» клетками смещалось в сторону последних. Гистограммы $\Delta\psi$ приобретают унимодальный характер и смещаются вправо, в сторону более высоких значений. К 8ч культивирования (фаза замедления роста и переход к ранней стационарной фазе) гистограмма $\Delta\psi$ снова приобретает бимодальный характер. Таким образом, в стационарной, как и в лаг-фазе клетки представлены двумя субпопуляциями, различающимися величиной $\Delta\psi$.

Гистограммы $\Delta\psi$ «ТНТ-клеток», в отличие от клеток контроля, сохраняют бимодальный характер по 6ч культивирования включительно. И только на 8ч смещаются вправо, в сторону больших значений $\Delta\psi$. Гистограмма приобретает унимодальный характер, что совпадает с элиминацией ТНТ из среды культивирования и увеличением размеров клеток.

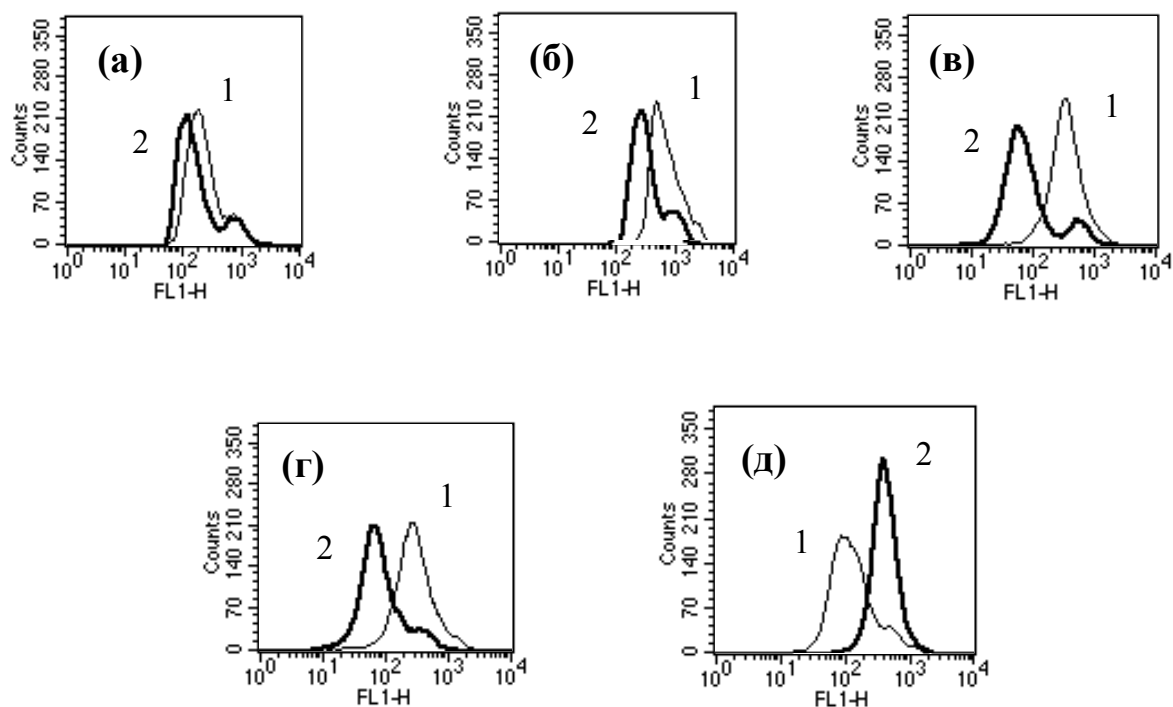


Рис. 12. Изменение мембранного потенциала клеток *E. coli* K12: а - за первые 15 мин.; б - на 2ч; в - на 4ч; г - на 6ч; д - на 8ч культивирования; 1 - клетки без ТНТ; 2 - с ТНТ (200 мг/л). На оси ординат - количество клеток; на оси абсцисс - мембранный потенциал, выраженный в условных единицах флуоресценции красителя DiOC₆(3).

Таким образом, ТНТ оказывает ингибирующее действие на механизмы, ответственные за энергетический статус бактерий. Это проявляется в снижении их мембранного потенциала, о чем свидетельствует смещение с 4ч по 6ч пиков гистограмм $\Delta\psi$ -«низких» и $\Delta\psi$ -«высоких» «ТНТ-клеток» влево. Вместе с тем, в условиях периодического культивирования ингибирование механизмов, обеспечивающих высокий уровень $\Delta\psi$, не летально. Оно носит транзиторный характер - после элиминации ксенобиотика эти механизмы активируются, обеспечивая восстановление $\Delta\psi$ в зоне $\Delta\psi$ - «высоких» «ТНТ - клеток» гистограммы.

Ранее было показано, что на ряду с уменьшением размеров часть «ТНТ-клеток» претерпевает морфологические изменения, превращаясь в округлые кокковидные клетки. При этом часть клеток, сохраняющая палочковидную форму, увеличивается по мере снижения в среде концентрации ТНТ. Мы расценили это как гетерогенность культуры, причина которой, возможно связана с различием в чувствительности к токсическому действию ТНТ. В условиях токсического пресса культура гетерогенна также по величине $\Delta\psi$, четко разделяясь на $\Delta\psi$ -«низкие» и $\Delta\psi$ -«высокие» «ТНТ-клетки». Возможно, это не частный случай, клетки контроля также гетерогенны по величине $\Delta\psi$, но эта гетерогенность выражена меньше, чем в клетках опыта, и проявляется в начале лаг фазы при переходе к стационарной фазе

роста культуры. Можно предположить, что неблагоприятные для роста и размножения клеток условия независимо от их природы могут индуцировать гетерогенизацию популяции с целью ее сохранения при помощи части клеток, наиболее устойчивых к губительным для большинства членов популяции условиям.

ВЫВОДЫ

1. Среди проанализированных штаммов *Escherichia coli* барьерные свойства внешней липопротеидной мембраны варьируют от штамма *Escherichia coli* K12, характеризующегося наиболее стабильной и наименее проницаемой внешней липопротеидной мембраной, до штамма *Escherichia coli* 055, с наименее стабильной и наиболее проницаемой внешней липопротеидной мембраной.

2. Штамм *Escherichia coli* K12 в условиях периодического восьмичасового культивирования способен практически полностью трансформировать максимальную концентрацию 2,4,6-тринитротолуола (200 мг/л), тогда как штамм *Escherichia coli* 055 трансформировал 2,4,6-тринитротолуол в этих условиях на 42 %.

3. Для трансформации 2,4,6-тринитротолуола штаммы *Escherichia coli* K12 и *Escherichia coli* 055 используют стратегии нитровосстановления и денитритации. У штамма *Escherichia coli* 055 переключение стратегии нитровосстановления на денитритацию происходит при более низкой концентрации 2,4,6-тринитротолуола, чем у штамма *Escherichia coli* K12, что совпадает с различиями в барьерных свойствах внешней липопротеидной мембраны, определяющей чувствительность к токсическому действию 2,4,6-тринитротолуола.

4. Токсическое действие 2,4,6-тринитротолуола в отношении штамма *Escherichia coli* K12, сопровождается морфологическими изменениями: уменьшением размеров клеток, увеличением удельной плотности и переходом части клеток популяции с палочковидной на кокковидную форму; физиологическими изменениями: снижением скорости утилизации глюкозы, уменьшением уровня восстановленных пиридиновых и окисленных флавиновых кофакторов

5. В присутствии 2,4,6-тринитротолуола у клеток *Escherichia coli* K12 зафиксировано снижение трансмембранного потенциала и изменение энергетического профиля популяции в целом. Тем не менее, на фоне выраженного токсического эффекта, популяция эффективно элиминирует ксенобиотик, нормализуя не только морфологические характеристики, но и трансмембранный потенциал и его популяционный профиль.

6. Разработан метод определения барьерных свойств внешней липопротеидной мембраны грамотрицательных бактерий, основанный на различии в чувствительности штаммов *Escherichia coli* к анионному поверхностно активному веществу

– натриевой соли ди-2-этилгексилового эфира сульфоянтарной кислоты (Аэрозоль ОТ, АОТ) и основному фуксину.

Работы, опубликованные по теме диссертации

1. Куриненко Б.М. Особенности токсического действия 2,4,6 – тринитротолуола в отношении *Escherichia coli* K12 / Б.М. Куриненко, Н.А. Дениварова, Р.Э. Давыдов, Г.Ю. Яковлева // Прикл. биохимия и микробиология.- 2006.- Т.42.- № 4.
2. Куриненко Б.М. Чувствительность различных штаммов *Escherichia coli* к токсическому действию 2,4,6 – тринитротолуола / Б.М. Куриненко, Н.А. Дениварова, Г.Ю. Яковлева // Прикл. биохимия и микробиология.- 2005.- Т.41.- № 1.- С.53-57.
3. Куриненко Б.М. Особенности токсического эффекта 2,4,6 – тринитротолуола в отношении *Bacillus subtilis* SK1 / Б.М. Куриненко, Г.Ю. Яковлева, Н.А. Дениварова, Ю.В. Абреимова // Прикл. биохимия и микробиология.-2003.- Т.39.- № 2.-С.194-198.
4. Куриненко Б.М. Влияние токсических концентраций 2,4,6 – тринитротолуола на физические свойства и морфологию клеток *Bacillus subtilis* SK1 / Б.М. Куриненко, Г.Ю. Яковлева, Н.А. Дениварова, Ю.В. Абреимова // Прикл. биохимия и микробиология.- 2003.- Т.39.- № 3.- С.313-317.
5. Куриненко Б.М. Влияние различных концентраций 2,4,6 – тринитротолуола на стратегию его трансформации штаммом *Bacillus sp. SK1* / Б.М. Куриненко, Г.Ю. Яковлева, Н.А. Дениварова, Ю.В. Абреимова; Казанский гос.ун-т.-Казань, 2002.- 19с.- Деп. В ВИНТИ 14.01.2002; № 59-В2002.
6. Дениварова Н.А. Влияние концентрации 2,4,6- тринитротолуола на использование *Bacillus sp. SK1* различных ферментативных систем его трансформации / Н.А. Дениварова, Г.Ю. Яковлева, Ю.В. Абреимова, Б. М. Куриненко // Ферменты микроорганизмов: Сборник докладов XII юбилейной конференции, Казань 2001г.- Казань,2001.-С.108-109.
7. Дениварова Н.А. Влияние барьерных свойств внешней липопротеидной мембраны *Escherichia coli* на стратегию трансформации 2,4,6-тринитротолуола / Н.А. Дениварова, Г.Ю. Яковлева, Б.М. Куриненко // Биология наука XXI века: Сборник тезисов / 7-ая Пущинская конференция молодых ученых, Пущино 14-18 апреля 2003 г. - Пущино, 2003. - С.272.
8. Дениварова Н.А. Влияние 2,4,6-тринитротолуола на физические свойства и морфологию клеток *Escherichia coli* K12 / Н.А. Дениварова, Г.Ю. Яковлева, Б.М. Куриненко // Биология наука XXI века: Сборник тезисов / 8-ая Пущинская конференция молодых ученых, Пущино 17-21 мая 2004 г. - Пущино,2004. - С.147.
9. Дениварова Н.А. Влияние барьерных свойств внешней липопротеидной мембраны на использование *Escherichia coli* различных ферментативных систем для детоксикации 2,4,6-тринитротолуола/ Н.А. Дениварова, Г.Ю. Яковлева, Б.М. Куринен-

ко //“Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение” XIII международная конференция, Казань 4-8 апреля, сб. тезисов Казань 2005 - с. 27-28.